

Riarrangiamento genico dei recettori per l'antigene nei linfociti B e T

La diversità dei recettori per l'Ag è prodotta durante lo sviluppo dei linfociti T e B negli organi linfatici primari

La maturazione è iniziata da segnali (recettori) e ha due scopi

1) Proliferazione dei progenitori

2) Riarrangiamento dei geni per i recettori specifici per l'Ag

Uno dei problemi fondamentali
con cui si sono cimentati
immunologi e genetisti è il modo
attraverso cui i linfociti sono in
grado di produrre un numero
enorme ($10^{11}/10^{18}$) e vedremo
perché, di diversi recettori per
l'Ag

Generazione della diversità

- Teoria dei geni multipli
- Teoria della mutazione somatica
- Teoria della ricombinazione somatica

Teoria dei geni multipli

- Un organismo eredita tutti i geni necessari per la sintesi di 10^{11} Ig cioè un gene per ciascuna proteina.

SPRECO DEL GENOMA!!!!!!

Teoria della mutazione somatica

Esiste un limitato numero di geni nella linea germinale che muta durante l'ontogenesi.

Si producono così geni diversi, espansi successivamente nei cloni di cellule B.

Teoria della ricombinazione somatica

Nel 1965 Dryer e Bennet postularono l'esistenza di due geni per ogni catena polipeptidica anticorpale: un gene per la parte V e un gene per la parte C.

Continua..... Teoria ricombinazione somatica

I geni V e C sarebbero separati tra loro nel genoma della linea germinale, ma durante il differenziamento uno dei molteplici geni V verrebbe avvicinato e legato ad un gene C (RICOMBINAZIONE) per formare il gene completo capace di codificare per una catena di Ig completa o per un recettore dei T

Oggi sappiamo che la combinazione di parti diverse di geni dei recettori per l'Ag sono assemblati per generare la

**grande diversità di questi
recettori**

e tutto ciò avviene in assenza di Ag
(nelle cellule B e T immature)

Il processo è detto

**RIARRANGIAMENTO
GENICO**

Quindi...prima di incontrare l'Ag, il
linfocita T e il linfocita B

«devono preparare»

i loro recettori

I geni che codificano i diversi recettori per gli Ag su linfociti T e B sono prodotti dall'avvicinamento di parti di geni della regione variabile (V), della Diversità (D) e di parti di geni Joining (J)

Questa operazione si chiama
Ricombinazione V (D) J

Il processo di selezione è casuale e al termine del riarrangiamento si formerà un
singolo esone
che codificherà per la regione variabile di un recettore per l'antigene

Ricombinazione dei geni della catena pesante e leggera delle Ig e produzione della proteina completa

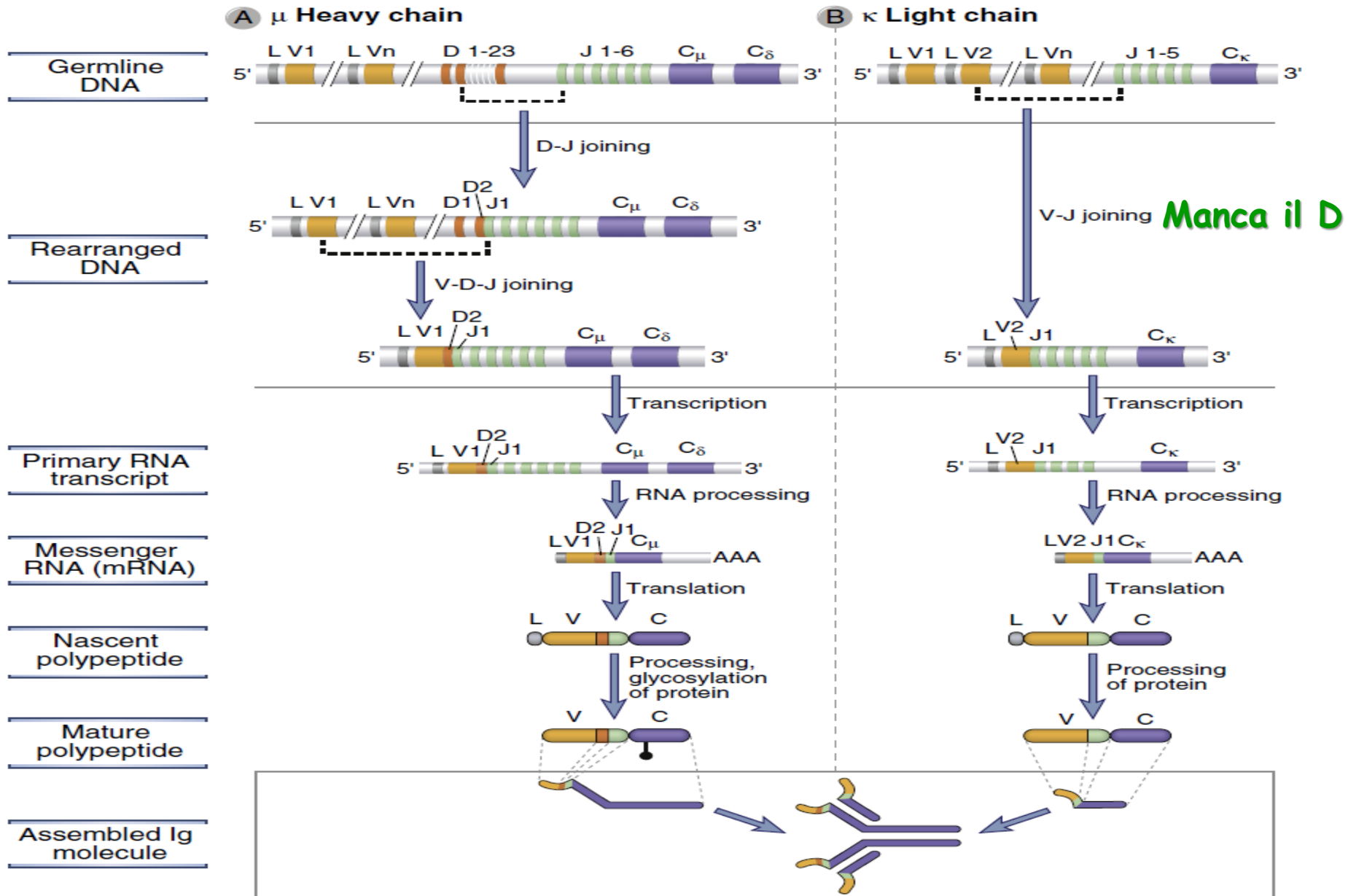


TABLE 8-1 Contributions of Different Mechanisms to the Generation of Diversity in Ig and TCR Genes

	Ig			TCR $\alpha\beta$		TCR $\gamma\delta$	
Mechanism	Heavy Chain	κ	λ	α	β	γ	δ
Variable (V) segments	45	35	30	45	50	5	2
Diversity (D) segments	23	0	0	0	2	0	3
D segments read in all three reading frames	Rare	—		—	Often	—	Often
N region diversification	V-D, D-J	None		V-J	V-D, D-J	V-J	V-D1, D1-D2, D1-J
Joining (J) segments	6	5	4	55	12	5	4
Total potential repertoire with junctional diversity	$\sim 10^{11}$			$\sim 10^{16}$		$\sim 10^{18}$	

The potential number of antigen receptors with junctional diversity is much greater than the number that can be generated only by combinations of V, D, and J gene segments. Note that although the upper limit on the numbers of Ig and TCR proteins that may be expressed is very large, it is estimated that each individual contains on the order of 10^7 clones of B and T cells with distinct specificities and receptors; in other words, only a fraction of the potential repertoire may actually be expressed.

Esempio di Ricombinazione

N° combinazioni = PRODOTTO delle diverse varianti dei singoli geni

$$V = 45$$

$$D = 23$$

$$J = 6$$

$$45 \times 23 = 1035$$

$$1035 \times 6 = 6210$$

Con 74 varianti di geni si ottengono 6210 combinazioni

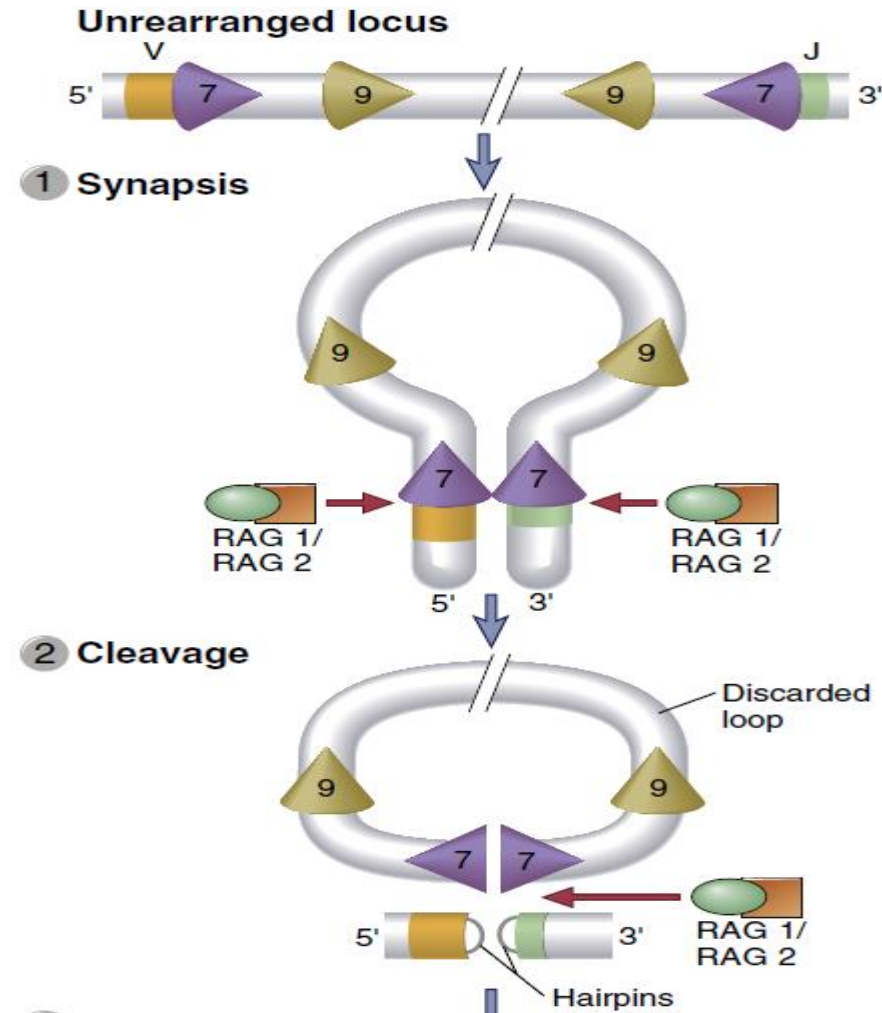
....non solo della catena pesante ma anche....

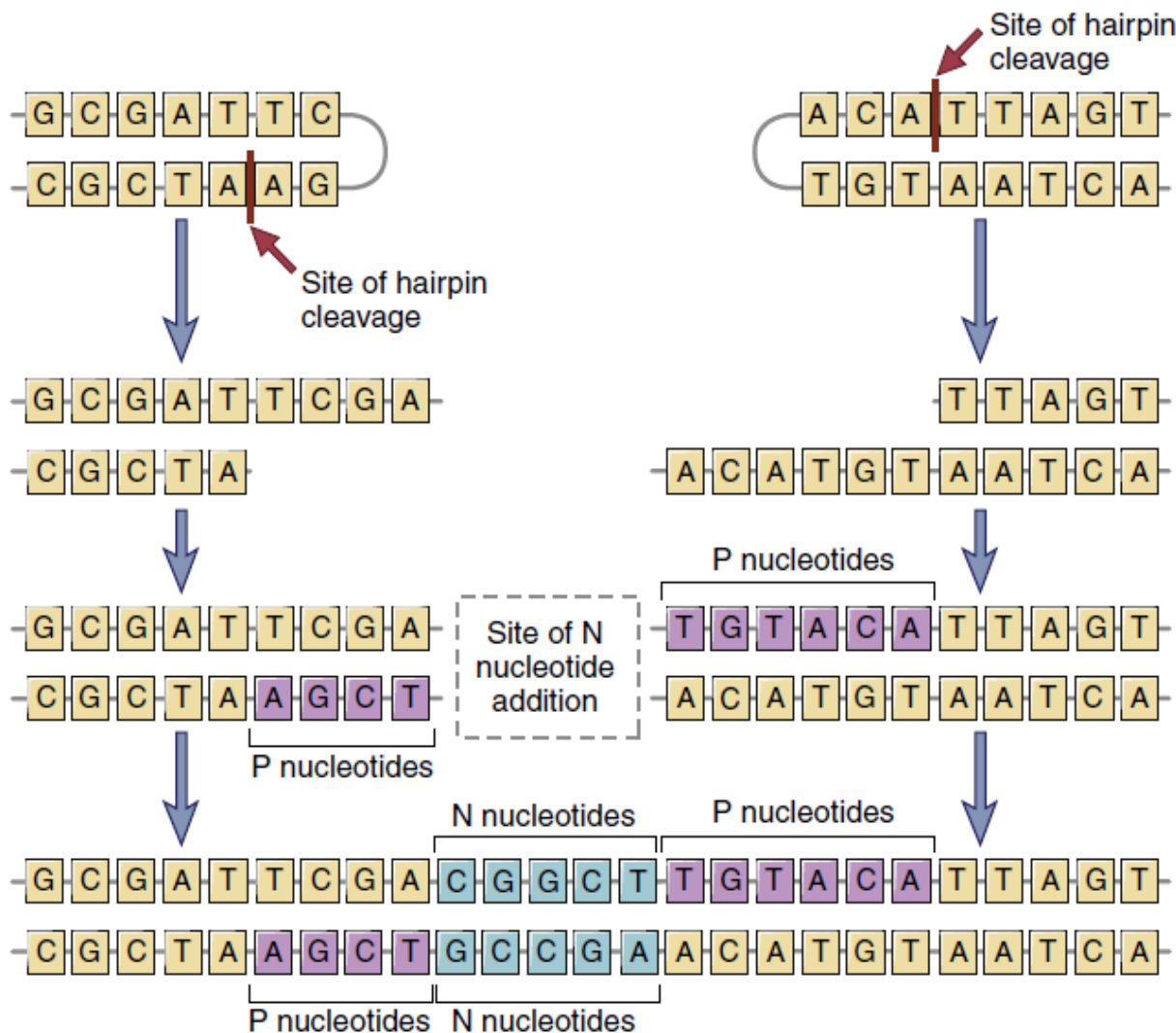
- Per la catena leggera Kappa ci sono 40 segmenti genici V e 5 segmenti J e le possibili combinazioni saranno 200 (40×5)
- Per la catena leggera Lambda ci sono 30 segmenti genici V e 4 J con 120 combinazioni

Enzimi del riarrangiamento

I principali enzimi del riarrangiamento sono RAG1 e RAG2 e sono dette ricombinasi . Questi enzimi vengono espressi transitoriamente durante la maturazione dei T e dei B.

Ordine di eventi durante il riarrangiamento VDJ





Inoltre quando RAG taglia la forcina del DNA e ripara il DNA interrotto può aggiungere sequenze di nucleotidi (nucleotidi P).

Durante il riarrangiamento genico (VDJ) si possono verificare errori di saldatura e questo aumenta la variabilità della catena prodotta. Delle nucleasi possono eliminare alcuni nucleotidi e l'enzima TdT (Trasferasi deossinucleotide Terminale) ne può aggiungere nuovi (nucleotidi N).

**AMPLIFICAZIONE
DEL REPERTORIO
CON LA DIVERSITA'
GIUNZIONALE**

Abbas, Lichtman, Pillai.
Cellular and Molecular
Immunology. 8 Ed. Elsevier

Repertorio del recettore per l'Ag 10^{11} anticorpi o recettori sulle cellule T

Diversità combinatoria (VDJ)

Diversità giunzionale

e.....

e..... la diversità giunzionale non è
ancora sufficiente!!!!!!!

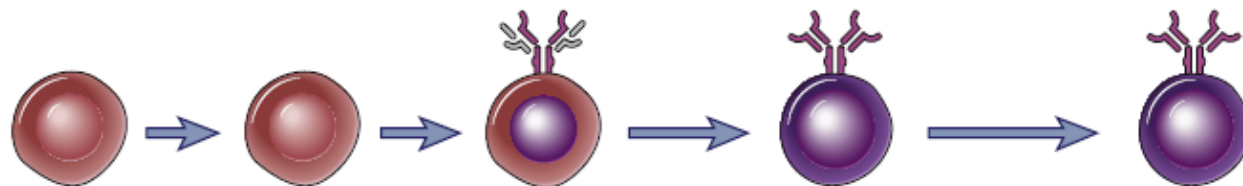
C'è ancora

l' IPERMUTAZIONE SOMATICA

IPERMUTAZIONE SOMATICA

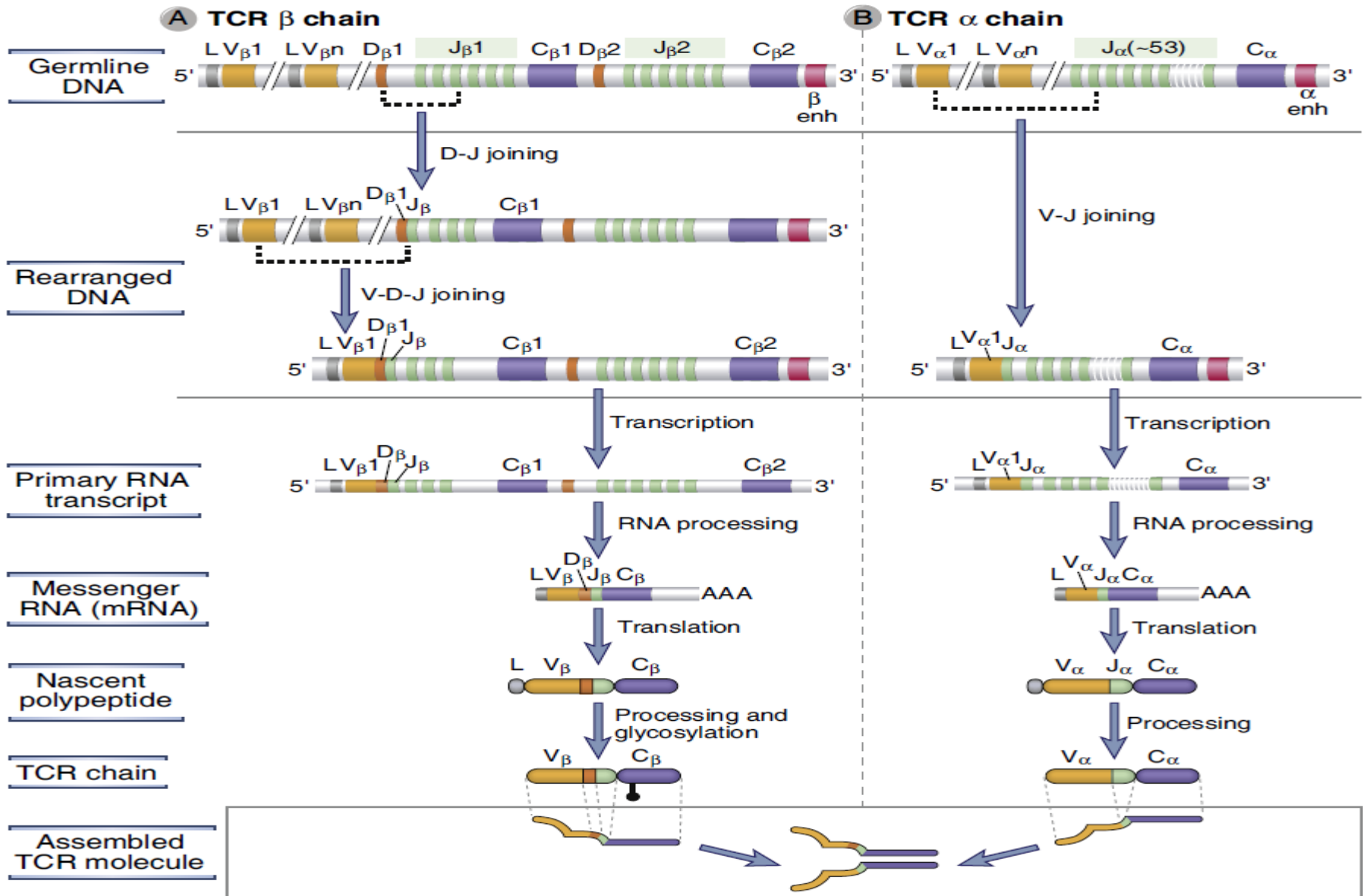
- Si ha nei **linfociti maturi** all'interno degli organi linfoidi periferici e consiste in **mutazioni puntiformi** nelle regioni dei geni V che determinano la complementarietà
- Alcune di queste **mutazioni** fanno sì che l'Ab generato abbia una migliore affinità per l'Ag e i linfociti B che producono queste Ig vengano selezionati positivamente.
- Si dice **maturazione dell'affinità** e si verifica solo nel corso delle risposte anticorpali verso Ag proteici, dipendenti dalla cooperazione dei linfociti T helper.

Tappe della maturazione dei linfociti B

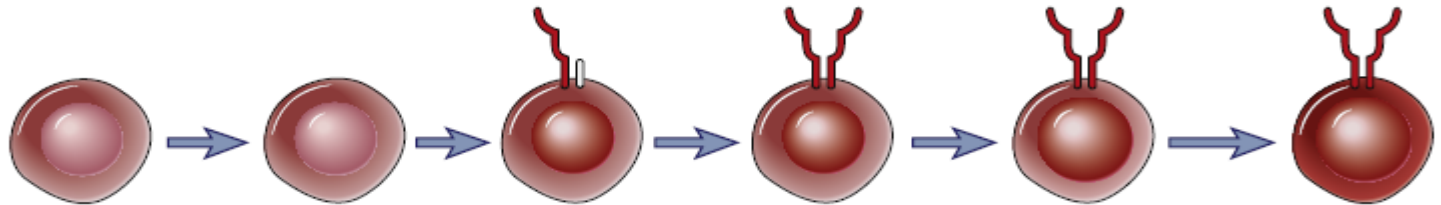





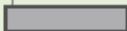

Stage of maturation	Stem cell	Pro-B	Pre-B	Immature B	Mature B
Proliferation	[Bar]			[Bar]	
RAG expression			[Bar]	[Bar]	
TdT expression		[Bar]			
Ig DNA, RNA	Unrecombined (germline) DNA	Unrecombined (germline) DNA	Recombined H chain gene (VDJ); μ mRNA	Recombined H chain gene (VDJ), κ or λ genes (VJ); μ or κ or λ mRNA	Alternative splicing of VDJ-C RNA (primary transcript), to form C_{μ} and C_{δ} mRNA
Ig expression	None	None	Cytoplasmic μ and pre-B receptor-associated μ	Membrane IgM (μ + κ or λ light chain)	Membrane IgM and IgD
Surface markers	CD43 ⁺	CD43 ⁺ CD19 ⁺ CD10 ⁺	B220 ^{lo} CD43 ⁺	IgM ^{lo} CD43 ⁻	IgM ^{hi}
Anatomic site	[Bar] Bone marrow			[Bar] Periphery	
Response to antigen	None	None	None	Negative selection (deletion), receptor editing	Activation (proliferation and differentiation)

Ricombinazione dei geni alfa e beta del TCR e produzione della proteina assemblata



Tappe della maturazione dei linfociti T



Stage of maturation	Stem cell	Pro-T	Pre-T	Double positive	Single positive (immature T cell)	Mature T cell
Proliferation						
RAG expression						
TdT expression						
TCR DNA, RNA	Unrecombined (germline) DNA		Recombined β chain gene [V(D)J-C]; β chain mRNA	Recombined β , α chain genes [V(D)J-C]; β and α chain mRNA		
TCR expression	None	None	Pre-T receptor (β chain/pre-T α)	Membrane $\alpha\beta$ TCR		
Surface markers	$c\text{-kit}^+$ CD44^+ CD25^-	$c\text{-kit}^+$ CD44^+ CD25^+	$c\text{-kit}^+$ CD44^- CD25^+	$\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ $\text{TCR/CD3}^{\text{lo}}$	$\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ or $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$ $\text{TCR/CD3}^{\text{hi}}$	
Anatomic site	Bone marrow	Thymus				Periphery
Response to antigen	None	None	None	Positive and negative selection		Activation (proliferation and differentiation)

**TABLE 2-2 Lymphocyte Classes**

Class	Functions	Antigen Receptor and Specificity	Selected Phenotype Markers	Percentage of Total Lymphocytes*		
				Blood	Lymph Node	Spleen
αβ T Lymphocytes						
CD4 ⁺ helper T lymphocytes	B cell differentiation (humoral immunity) Macrophage activation (cell-mediated immunity) Stimulation of inflammation	αβ heterodimers Diverse specificities for peptide–class II MHC complexes	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 [–]	35–60 [†]	50–60	50–60
CD8 ⁺ cytotoxic T lymphocytes	Killing of cells infected with viruses or intracellular bacteria	αβ heterodimers Diverse specificities for peptide–class I MHC complexes	CD3 ⁺ , CD4 [–] , CD8 ⁺	15–40	15–20	10–15
Regulatory T cells	Suppress function of other T cells (regulation of immune responses, maintenance of self-tolerance)	αβ heterodimers Specific for self and some foreign antigens (peptide–class II MHC complexes)	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ (most common, but other phenotypes as well)	Rare	10	10
NKT cells	Suppress or activate innate and adaptive immune responses	αβ heterodimers Limited specificity for glycolipid–CD1 complexes	CD56, CD16 (Fc receptor for IgG), CD3	5–30	Rare	10
γδ T lymphocytes	Helper and cytotoxic functions (innate immunity)	γδ heterodimers Limited specificities for peptide and nonpeptide antigens	CD3 ⁺ , CD4 and CD8 variable	Rare	Rare	Rare
B Lymphocytes						
Follicular B cells	Antibody production (humoral immunity)	Surface Ig Diverse specificities for many types of molecules	Fc receptors, class II MHC, CD19, CD23	5–20	20–25	40–45
Marginal zone B cells	Antibody production (humoral immunity)	Surface Ig Limited specificities for a restricted set of molecules	IgM, CD27	2–3	3–5	7–10

This table summarizes the major properties of the lymphocytes of the adaptive immune system. Not included are NK cells and other innate lymphoid cells, which are discussed in Chapter 4.

*The percentages are approximations, based on data from human peripheral blood and mouse lymphoid organs.

[†]In most cases, the ratio of CD4⁺CD8[–] to CD8⁺CD4[–] is about 2:1.

Ig, immunoglobulin; *MHC*, major histocompatibility complex.